

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 219**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2010** **E 10700705 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2387586**

54 Título: **Anticuerpos contra el receptor de la EPO humana**

30 Prioridad:

15.01.2009 EP 09000499

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.02.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

JARSCH, MICHAEL;
KUBBIES, MANFRED;
MUNDIGL, OLAF y
TORRES-NAGEL, NORA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 528 219 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el receptor de la EPO humana

5 Antecedentes de la invención

La eritropoyetina (EPO) humana es una glucoproteína de 166 aminoácidos (aa) que participa en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides. Estas respuestas celulares están mediadas por el receptor de la EPO humana (EPO-R), una glucoproteína de 508 aa. El receptor de la EPO humana (EPO-R) es una proteína de 10
508 aminoácidos de longitud (Swiss Prot P19235) que contiene un único dominio transmembranal y que ha sido clasificada como miembro de la subfamilia de receptores de citoquina de clase I de las hormonas de crecimiento. El EPO-R ha sido descrito en, por ejemplo, Winkelmann J.C. *et al.*, Blood 76:24-30, 1990, y Jones S.S. *et al.*, Blood 76:31-35, 1990. La activación de EPO-R se produce mediante dimerización (Matthews D.J., PNAS 93:9471-9476, 1996). EPO-R comprende ocho sitios de tirosina citoplasmáticos que resultan fosforilados tras la estimulación con EPO (Li K. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:40702-40709, 2003; Wu H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1806-1810, 15
1997), resultando en "EPO-R activado".

Los anticuerpos contra EPO-R son conocidos a partir de, por ejemplo, Andrea A.D., Blood 82:46-52, 1993; Elliott S., Blood 107:1892-1895, 2006; Kirkeby A., J. Neurosci. 164:50-58, 2007; Miura, O., Arch. Biochem. 306 (1993) 200-208; and EP 1 146 056, EP 1 327 681, EP 0 773 962, EP 0 776 370, US 2002/0031806, US 2003/0215444, US 2004/0058393, US 2004/0071694, US 2004/0175379, US 2005/0227289, US 2005/0244409, US 2006/0018902, US 6.998.124, US 7.053.184, US 7.081.523, WO 1995/005469, WO 1996/003438, WO 2000/061637, WO 2004/035603 A2, WO 2005/100403 A2. Sin embargo, es conocido a partir del estado de la técnica que los anticuerpos conocidos contra EPO-R no son capaces de discriminar entre EPO-R no activado y activado (ver Jelkmann W. *et al.*, Crit. Rev. Onc./Hematol. 67:39-61, 2008; Li K. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:40702-40709, 2003, y Wu, H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1806-1810, 1997). 20
25

Barber D. L. *et al.* informan de que un el transductor de señales activado y activador de transcripción S (STAT5) y el receptor de eritropoyetina fosforilado presentan un epítipo común a ambos, con implicaciones para el modelo de anclaje de activación de STAT (Blood 97:2230-2237, 2001). 30

Sytkowski A.J. informan de la biología de los receptores y la transducción de señales de la eritropoyetina (Erythropoietin, WILEYVCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, Weinheim, Alemania, páginas 73 a 100, 2004).

Damen J.E. *et al.* informan de que la fosforilación de la tirosina 503 en el receptor de eritropoyetina (EpR) resulta esencial para la unión de la subunidad P85 de la fosfatidil-inositol (PI) 3-quinasa y para la actividad de la PI 3-quinasa asociada al EpR (J. Biol. Chem. 270:23402-23408, 1995). 35

Miller B.A. *et al.* informan de la identificación del dominio de receptor de eritropoyetina necesario para la activación de los canales del calcio (J. Biol. Chem. 274:20465-20472). 40

Arai A. *et al.* informan de que CrkL es atraído mediante su dominio SH2 al receptor de eritropoyetina y desempeña un papel en la señalización de receptores mediada por Lyn (J. Biol. Chem. 276:33282-33290, 2001).

Wu H. *et al.* informan de que la interacción funcional entre la eritropoyetina y los receptores de factores de células madre resulta esencial para la formación de colonias eritroides (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1806-1810, 1997). 45

Bergelson S. *et al.* informan de que los residuos de tirosina dentro del dominio intracelular del receptor de eritropoyetina son intermediarios de la activación de los factores de transcripción AP-1 (J. Biol. Chem. 273:2396-2401, 1998). 50

El anticuerpo monoclonal de conejo anti-EpoR fosfo (pY485) se encuentra disponible comercialmente de Epitomics Inc. (número de cat. 2585-1).

55 Descripción resumida de la invención

La invención comprende un anticuerpo de unión específica a receptor de EPO humana activado y la discriminación entre EPO-R no activado y activado, lo que permite el análisis específico de la activación de EPO-R, especialmente en células y biopsias procedentes de tejido humano. 60

La invención comprende un anticuerpo, caracterizada por la unión específica del fragmento de receptor de EPO humana GLSDGPYSNPYENSLIP (SEC ID nº 26), que comprende un residuo fosfotirosilo en la posición 465 (subrayado).

La numeración se refiere a la secuencia de aminoácidos del receptor de EPO de UniProtKB/Swiss-Prot P19235 sin péptido de señal.

5 Un anticuerpo según la invención no se une al fragmento de receptor de EPO humana GLSDGPYSNPYENSLIP (SEC ID nº 26) sin un residuo fosfotirosilo en la posición 465.

10 Un anticuerpo según la invención se une específicamente a receptor de EPO (activado) fosforilado en lisados de células UT7, las cuales expresan EPO-R en una cantidad de entre 100.000 y 500.000 receptores por cada célula (células que expresan EPO-R) y que se tratan con 500 pM de EPO para la activación. Un anticuerpo según la invención no se une a receptor de EPO en lisados de células UT7 que expresan receptor de EPO y que no se tratan con EPO. Dicha unión puede medirse mediante transferencia western.

15 El anticuerpo se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de secuencia SEC ID nº 17, una región CDR2 de secuencia SEC ID nº 18 y una región CDR1 de secuencia SEC ID nº 19 y porque el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de secuencia SEC ID nº 20, una región CDR2 de la secuencia SEC ID nº 21 y una región CDR1 de la secuencia SEC ID nº 22.

20 El anticuerpo se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia SEC ID nº 23, y el dominio variable de cadena ligera es la secuencia SEC ID nº 24.

Preferentemente, el anticuerpo según la invención se caracteriza por la unión a EPO-R con una afinidad de unión de por lo menos 10^{-8} M^{-1} a 10^{-12} M^{-1} .

25 Las cadenas constantes humanas y otras cadenas constantes son bien conocidas del estado de la técnica y por ejemplo han sido descritas por Kabat (ver, por ejemplo, Johnson G. y Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28:214-218, 2000). Resulta preferente además que el anticuerpo se obtenga del ratón y comprenda un marco de secuencia variable del anticuerpo procedente de un anticuerpo de ratón según Kabat (ver, por ejemplo, Johnson G. y Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28:214-218, 2000).

30 El anticuerpo según la invención preferentemente se obtiene de ratón, conejo o ser humano. Resulta preferente como anticuerpo humano el isotipo IgG1.

35 En la presente memoria se proporcionan vectores de expresión que contienen ácidos nucleicos capaces de expresar dichos ácidos nucleicos en una célula huésped procariótica o eucariótica, y células huésped que contienen dichos vectores para la producción recombinante de dicho anticuerpo.

40 En la presente memoria se proporciona una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un vector tal como se proporciona en la presente memoria.

45 En la presente memoria se proporciona un método para la producción de un anticuerpo humanizado o humano recombinante según la invención, caracterizado porque se expresa un ácido nucleico tal como se proporciona en la presente memoria en una célula huésped procariótica o eucariótica y se recupera dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular.

La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención con el fin de determinar/detectar células de mamífero que portan/expresan receptor de EPO activado.

50 Se utiliza un anticuerpo según la invención para determinar el receptor de EPO activado en lisados de biopsias de muestras de tejido humano. Preferentemente dicha detección se lleva a cabo mediante transferencia western.

Descripción detallada de la invención

55 El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de estructura de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpo.

60 La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o por lo menos el sitio de unión de antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston J.S., Methods in Enzymol. 203:46-88, 1991. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de cadena sencilla que presentan las características de un dominio V_H , es decir la capacidad de ensamblarse con un dominio V_L , o de un dominio V_L , es decir la capacidad de ensamblarse

conjuntamente con un dominio V_H con un sitio de unión de antígeno funcional y proporcionar de esta manera las propiedades de un anticuerpo de unión específica a EPO-R humano.

5 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que la región marco y/o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especie diferente de la que procede la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR de ratón en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985.

10 La expresión "comprende una región CDR3 de cadena pesada de SEC ID nº 1" se refiere a que el anticuerpo comprende como secuencia de su región CDR3 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1. Indica lo mismo para las otras regiones CDR del anticuerpo.

15 La expresión "unión a EPO-R activado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo a EPO-R activado humano en un ensayo de unión bioquímico medida mediante transferencia western. Se observa la unión en el caso de que el anticuerpo cause una proporción S/R (señal/ruido) de 400 ó superior a una concentración de anticuerpo de 1 µg/ml. La expresión "falta de unión a EPO-R" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo a EPO-R activado humano en un ensayo de unión bioquímico medida mediante transferencia western. No se observa unión en el caso de que el anticuerpo cause una proporción S/R (señal/ruido) inferior a 400 a una concentración de anticuerpo de 1 µg/ml. La unión de los anticuerpos según la invención a EPO-R no activado no es detectable en transferencias western, por lo tanto la proporción S/R es incluso inferior a 10 y de aproximadamente 1 ó inferior.

25 La expresión "unión de EPO a receptor de EPO" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión de la EPO a EPO-R activado humano en un ensayo de unión bioquímico medida mediante transferencia western. No se observa unión en el caso de que la EPO cause una proporción S/R (señal/ruido) no superior a 10 a una concentración de EPO de 1 µg/ml.

30 El término "pY430" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido sintético de 17 aminoácidos correspondiente a los residuos 424 a 437 del receptor de eritropoyetina humana maduro (TPPHLKLYLVVSD, SEC ID nº 25), que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 430. El término "pY461" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido sintético de 17 aminoácidos correspondiente a los residuos 455 a 471 del receptor de eritropoyetina humana maduro (GLSDGPYSNPYENSLIP, SEC ID nº 26), que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 461. El término "pY465" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido sintético de 17 aminoácidos correspondiente a los residuos 455 a 471 del receptor de eritropoyetina humana maduro (GLSDGPYSNPYENSLIP, SEC ID nº 26), que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 465.

40 El anticuerpo según la invención se caracteriza por la unión específica a pY465 en ELISA a una proporción S/R de 10 ó superior a una concentración de anticuerpo de 0,1 µg/ml.

45 La expresión "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (V_L), dominio variable de una cadena pesada (V_H)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada uno de los dominios de la pareja dominio de cadena ligera-dominio de cadena pesada que participan directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hojas β . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención.

55 La expresión "porción de unión a antígeno de un anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La parte de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad", o "CDR". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, los dominios variables de cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de los antígenos y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

Las expresiones “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico”, tal como se utilizan en la presente memoria, pretenden incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, aunque preferentemente es ADN de doble cadena.

El término “aminoácido” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al grupo de carboxi α -aminoácidos naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P.), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Un ácido nucleico se encuentra “operablemente ligado” en el caso de que se encuentre en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión “operablemente ligado” se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son colineales y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que no existan dichos sitios, se utilizan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada.

La invención comprende un método para detectar o determinar EPO-R activado en células, tejidos y biopsias humanas.

La invención comprende la utilización de un anticuerpo según la invención para el diagnóstico de EPO-R activado en células, tejidos y biopsias humanas.

Entre los anticuerpos según la invención se incluyen, además, anticuerpos que presentan “modificaciones de secuencia conservadoras” (anticuerpos variantes), modificaciones de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo según la invención. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándares conocidas de la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen aquellas en las que se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-EPO-R humano puede sustituirse preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Por lo tanto, un anticuerpo anti-EPO-R “variante” se refiere en la presente memoria a una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos diferente de una secuencia “parental” de aminoácidos de anticuerpo anti-EPO-R en hasta 10, preferentemente en aproximadamente entre dos y aproximadamente cinco adiciones, deleciones y/o sustituciones en una o más regiones variables del anticuerpo parental. Pueden llevarse a cabo sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis basándose en el modelaje molecular, tal como describen Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989.

Los anticuerpos según la invención preferentemente se producen por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión mediante métodos estándares. La

expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como las células CHO, las células NS0, las células SP2/0, las células HEK293, las células COS, las levaduras o las células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera a partir de las células (del sobrenadante o tras la lisis de las células).

5 La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida del estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17:183-202, 1999; Geisse S. *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8:271-282, 1996; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16:151-161, 2000; Werner R.G., *Drug Res.* 48:870-880, 1998.

10 Los anticuerpos pueden encontrarse presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o en forma sustancialmente pura. Se llevó a cabo la purificación con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis en gel de agarosa, y otras bien conocidas de la técnica (ver Ausubel F. *et al.*, editor, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

15 La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes L.M. *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123, 2000; Barnes L.M. *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher Y. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 30:E9, 2002. La clonación de los dominios variables ha sido descrita por Orlandi R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837, 1989; Carter P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289, 1992, y Norderhaug L. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) ha sido descrito por Schlaeger E.-J. y Christensen K., en *Cytotechnology* 30:71-83, 1999, y por Schlaeger E.-J., *J. Immunol. Methods* 194:191-199, 1996.

25 Se separan convenientemente anticuerpos monoclonales a partir del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

35 Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-EPO-R humano mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tales como el isotipo de IgG y la unión de epítopos, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

40 También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-EPO-R, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

45 Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-EPO-R se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o sitio-dirigida), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de anticuerpo anti-EPO-R humanizado.

55 Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras según la invención se combinan con secuencias de promotor, de inicio de traducción, región constante, región 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y de cadena ligera pueden agruparse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse separadamente en células huésped que seguidamente se fusionan para formar una única célula huésped que exprese ambas cadenas.

Descripción de las secuencias

60 SEC ID nº 1 CDR3 de cadena pesada, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 2 CDR2 de cadena pesada, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 3 CDR1 de cadena pesada, mAb C1.16.7.5

SEC ID nº 4	CDR3 de cadena ligera, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 5	CDR2 de cadena ligera, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 6	CDR1 de cadena ligera, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 7	dominio variable de cadena pesada, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 8	dominio variable de cadena ligera, mAb C1.16.7.5
SEC ID nº 9	CDR3 de cadena pesada, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 10	CDR2 de cadena pesada, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 11	CDR1 de cadena pesada, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 12	CDR3 de cadena ligera, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 13	CDR2 de cadena ligera, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 14	CDR1 de cadena ligera, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 15	dominio variable de cadena pesada, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 16	dominio variable de cadena ligera, mAb C1,8.70,16
SEC ID nº 17	CDR3 de cadena pesada, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 18	CDR2 de cadena pesada, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 19	CDR1 de cadena pesada, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 20	CDR3 de cadena ligera, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 21	CDR2 de cadena ligera, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 22	CDR1 de cadena ligera, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 23	dominio variable de cadena pesada, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 24	dominio variable de cadena ligera, mAb C1,240,110,31
SEC ID nº 25	péptido sintético
SEC ID nº 26	péptido sintético

Descripción de las figuras

5 **Figura 1:** Fosforilación dependiente del tiempo de EPO-R humano en células UT-7 EPO-R. Análisis de transferencia western de lisados de células UT7-EPO-R teñidas con diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra EPO-R humano fosforilado. (a) pY430 (Cl.16.7.5), (b) pY461 (Cl.8.7.16), (c) pY465 (Cl.24.11.31). Todos los anticuerpos monoclonales detectan específicamente EPO-R únicamente al estimular las células con EPO; las células no estimuladas (-) no resultan marcadas por los anticuerpos. Como control de carga se utilizó GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

10

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales anti-EPO-R fosfoespecíficos

15 pY430 (Cl.16.7.5): como inmunógeno se utilizó un péptido sintético de 17 aminoácidos correspondiente a los residuos 424 a 437 del receptor de eritropoyetina humana maduro (TPPHLKLYLVVSD, SEC ID nº 25), que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 430.

20 pY461 (Cl.8.7.16): como inmunógeno se utilizó un péptido sintético de 17 aminoácidos correspondiente a los residuos 455 a 471 del receptor de eritropoyetina humana maduro (GLSDGPYSNPYENSLIP, SEC ID nº 26), que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 461.

25 pY465 (Cl.24.11.31): como inmunógeno se utilizó un péptido sintético de 17 aminoácidos correspondiente a los residuos 455 a 471 del receptor de eritropoyetina humana maduro (GLSDGPYSNPYENSLIP, SEC ID nº 26), que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 465.

30 Para la inmunización se acoplaron los péptidos a KLH mediante una cisteína C-terminal. Se inmunizaron ratones Balb/c con inmunógeno cada cuatro semanas 3 veces, seguido de un refuerzo i.v.; el día 4 antes de la fusión se recolectaron los esplenocitos y se fusionaron con células de mieloma Ag8. El cribado para anticuerpos fosfo-específicos se llevó a cabo mediante ensayo diferencial de la forma fosfo frente a la forma no fosfo del péptido (que de otro modo era idéntico al fosfopéptido) utilizando placas de microtitulación de ELISA recubiertas con péptido siguiendo procedimientos estándares. Se seleccionaron los clones de anticuerpo que detectaban una banda específica correspondiente al EPO-R en membranas western de lisados celulares que habían sido estimulados con EPO (Ejemplo 2).

35

SDS-PAGE y transferencia western:

- 5 Se llevaron a cabo el SDS-PAGE y transferencia western según procedimientos estándares y el sistema de gel Nupage[®] de Invitrogen. Los lisados, correspondientes a 5×10^4 - 10^5 células, se cargaron en cada línea de un gel Bis-Tris al 4-12% Nupage[®] Novex. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) y se incubaron con los anticuerpos y anticuerpo anti-GAPDH (Abcam m9484, Abcam plc, Reino Unido) durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Tras el lavado, las membranas se incubaron con un conjugado de anticuerpo anti-IgG de ratón-POD y se revelaron utilizando reactivos ECL (sustrato de transferencia western Lumi-LightPLUS, Roche Applied Science n° 2015218).
- 10 Se seleccionaron los anticuerpos Cl.24.11.31, Cl.16.7.5 y Cl.8.7.16 como de unión específica a receptor de EPO activado sin unión a receptor de EPO no activado (fig. 1).

Ejemplo 2

- 15 Activación de células UT-7

La línea de células UT-7 es una línea celular eritroleucémica dependiente de factor humano (línea celular de leucemia mieloide aguda de médula ósea humana DSMZ: ACC 137), que requiere EPO para el crecimiento a largo plazo. Se mantuvieron las células UT7 en medio RPMI que comprendía además de L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (1x) y piruvato sódico (1 mM) (medio de ayuno), complementado con suero de feto bovino al 10% y 10 U/ml de GM-CSF. Las células transducidas (UT7/EPO-R) se mantuvieron en el mismo medio que las no transducidas (25 U/ml de GM-CSF en lugar de 10 U/ml) con la adición de 0,4 mg/ml de zeocina. Antes de cada estimulación las células se sometieron a ayuno mediante la incubación durante la noche en medio RPMI complementado con L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (1x), piruvato sódico (1 mM) y suero de feto bovino al 0,1%.

Transducción:

- 30 Se transdujeron células UT-7 con el sobrenadante de células GP2-293 (Clontech Laboratories, Inc.) transfectadas transitoriamente con un vector de expresión retrovírico codificante de EPO-R_h y pVSV-G (un vector de expresión codificante de la glucoproteína G del rabdovirus de la estomatitis vesicular). Dos días después de la transducción, el medio se sustituyó por RPMI fresco que contenía 0,4 mg/ml de zeocina y 25 U/ml de GM-CSF. Tras la selección se obtuvo una línea celular de células UT-7 de expresión estable de EPO-R sobre su superficie.

- 35 Estimulación:

Se estimularon durante los tiempos indicados células sometidas a ayuno de suero, con 500 pM de eritropoyetina en medio de ayuno (complementado con suero de feto bovino al 0,1%) a 37°C durante 1, 3 y 5 minutos. Tras la estimulación, las células se centrifugaron, se descartó el medio y el pellet se incubó en tampón de lisis helado [Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 137 mM, glicerol al 10%, Nonidet[®] P-40 al 1%, inhibidores de proteasa 1x (Pierce, n° 78410), inhibidores de fosfatasa 1x (Pierce n° 78420)] durante 30 minutos a 4°C, seguido de centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante del lisado se sometió a ebullición en tampón para muestras (Nupage[®], Invitrogen) en presencia de un agente reductor y se utilizó directamente para la SDS-PAGE.

- 45 Se sometió a ensayo la unión específica de los mAAb mediante ELISA en placas de microtitulación recubiertas con el péptido biotinilado correspondiente siguiendo procedimientos estándares, tal como se indica en el Ejemplo 1. Ya en 1 min. pudo demostrarse una clara activación del EPO-R humano, mientras que las células no estimuladas no mostraron ningún nivel basal detectable de activación.

50 Ejemplo 3

Ensayo de transferencia western de mAAb a células UT-7/EPO-R activadas con EPO

- 55 Se estimularon células UT7/EPO-R tal como se ha indicado anteriormente y se analizaron mediante transferencia western. En la transferencia western, los mAAb identifican una banda en un PM de 66 kD correspondiente al EPO-R (fig. 1) en las células que han sido estimuladas con 0,5 nM de EPO durante 1 a 5 min. Ya dentro del primer min. puede demostrarse una clara activación del EPO-R humano, mientras que las células no estimuladas no muestran ningún nivel basal detectable de activación (fig. 1). Como control de carga se utilizó GAPDH. De esta manera, estos anticuerpos analizan específicamente la activación de EPO-R por los AEE (agentes estimulantes de eritropoyetina).

- 60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Anticuerpos contra el receptor de la EPO humana

<130> 25709 WO

5 <150> EP09000499
<151> 2009-01-15

<160> 26

10 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr
1 5

20 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <400> 2

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Val Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

30 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Phe Asp Phe Ser Arg His Trp Val Asn
1 5 10

35 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

40 <400> 4

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

45 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

50 <400> 5

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

55

ES 2 528 219 T3

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 6
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Phe Met His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 7
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg His
 20 25 30

Trp Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Val Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Lys Val Ser Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

15

Val Arg Gly Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<400> 8

ES 2 528 219 T3

Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Phe Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Asp
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 9

Arg Gly Phe Asn Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 His Val Arg Asn Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Gly Ala Ser
 1 5 10 15

20 Val Lys Asp

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 11

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr Gly Met Asn
 1 5 10

30 <210> 12
 <211> 9

ES 2 528 219 T3

<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 12
5
His Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5
<210> 13
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 13
15 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5
<210> 14
<211> 17
20 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 14
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
25 Ala
<210> 15
<211> 121
<212> PRT
30 <213> Mus musculus
<400> 15

ES 2 528 219 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala His Val Arg Asn Arg Thr Asn Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Gly Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Leu
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Leu Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Arg Gly Phe Asn Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

5 <210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 16

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

ES 2 528 219 T3

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Ala Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

5 <210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 17
His Gly Gly Tyr Gln Gly Ile Ser Arg Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

Arg Ile Arg Thr Asn Asn Asn Asn Tyr Glu Val Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

20 <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <400> 19
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
1 5 10

30 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 20
Ser Gln Asn Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

40 <210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser
1 5

ES 2 528 219 T3

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 22
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asp Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His
 1 5 10 15
 10 <210> 23
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gln Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Thr Asn Asn Asn Asn Tyr Glu Val Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Glu Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Gly Tyr Gln Gly Ile Ser Arg Tyr Ala Met
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 20 <210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 24

ES 2 528 219 T3

Asp Phe Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asp
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Met Lys
 100 105 110

5 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 25

Thr Pro Pro His Leu Lys Tyr Leu Tyr Leu Val Val Ser Asp
 1 5 10

15 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Leu Ser Asp Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Glu Asn Ser Leu Ile
 1 5 10 15

20 Pro

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo de unión al receptor de EPO humana, caracterizado por la unión específica al fragmento de receptor de EPO GLSDGPYSNPYENSLIP (SEC ID nº 26) que comprende un residuo fosfo-tirosilo en la posición 465, en el que el anticuerpo se une específicamente a receptor de EPO humana activado y discrimina entre EPO-R no activado y activado, el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEC ID nº 17, una región CDR2 de SEC ID nº 18 y una región CDR1 de SEC ID nº 19 y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de SEC ID nº 20, una región CDR2 de SEC ID nº 21 y una región CDR1 de SEC ID nº 22, y en el que el anticuerpo se une específicamente a pY465 en ensayo ELISA en una proporción S/R de 10 ó superior a una concentración de anticuerpo de 0,1 µg/ml.
- 10
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia SEC ID nº 23, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia SEC ID nº 24.
- 15
3. Utilización de un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 2 para la determinación de receptor de EPO activado en células, tejidos y biopsias humanas.
- 20
4. Utilización según la reivindicación 3, caracterizada por que la muestra es un lisado de tejido humano.
5. Utilización según la reivindicación 4, caracterizada por que la determinación se lleva a cabo mediante transferencia western o ELISA.

Fig. 1

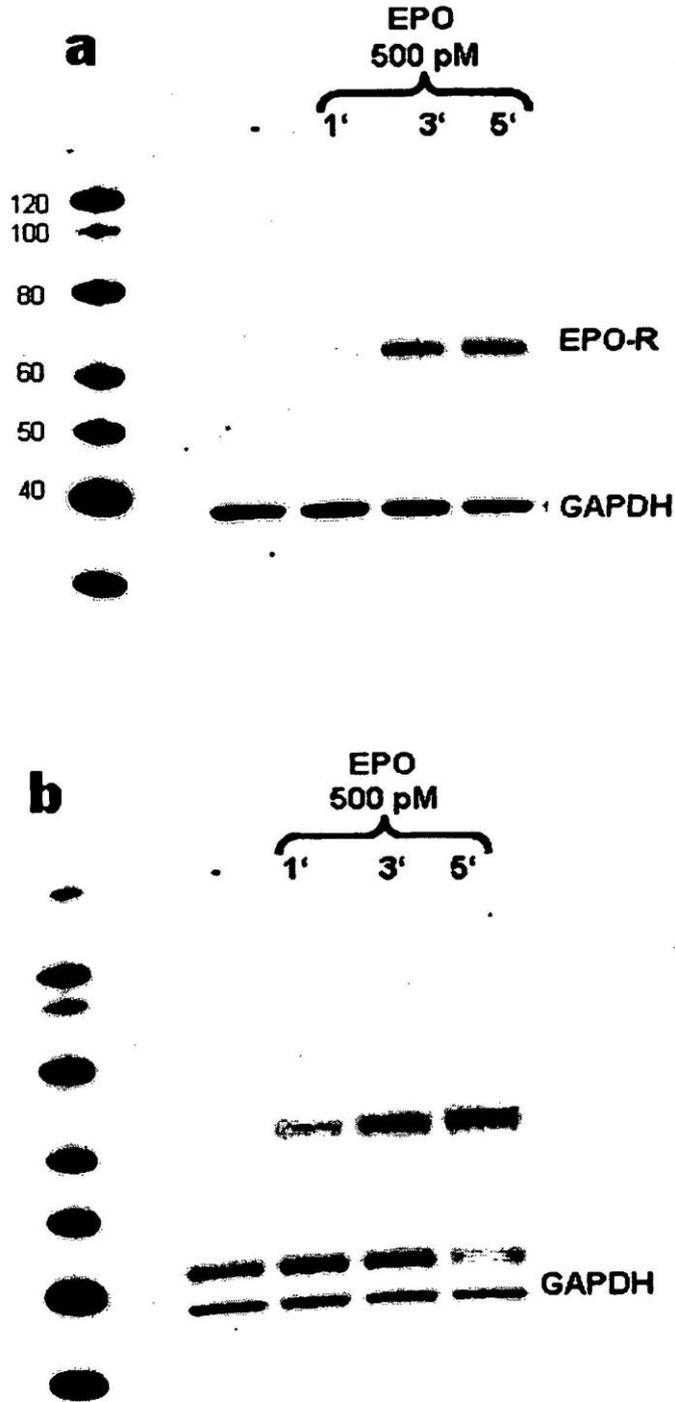


Fig. 2

